

黄曲霉毒素 B1 对肝癌细胞 HepG2 生物物理学特性及细胞骨架结构的影响

于欢¹, 喻艳琴^{1,2}, 钱天宝¹, 刘清玉¹, 王赟², 曾柱², 胡祖权^{1,2}

摘要 目的 研究黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 对人肝癌细胞 (HCCs) 生物物理学特性及细胞骨架结构的影响。方法 利用 0、0.01、0.1、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1 分别处理 HepG2 细胞 24 h 和 48 h, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。在此基础上, 分析 10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1 对细胞渗透脆性、膜流动性、细胞电泳率和 F-actin 骨架结构的影响。随后, 提取细胞总 RNA, 通过实时荧光定量 PCR 检测 12 种主要细胞骨架结合蛋白的转录水平变化。结果 AFB1 处理 48 h 时 HepG2 细胞的活力呈剂量依赖性增强。10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1 处理能够增强 HepG2 细胞抗低渗能力及细胞电泳率, 细胞骨架 F-actin 含量明显增加, 主要细胞骨架结合蛋白的 mRNA 表达发生改变。结论 AFB1 能够影响 HepG2 细胞的生物物理学特性、细胞骨架结构及其结合蛋白, 这可能与其毒性作用直接相关。

关键词 黄曲霉毒素; 肝癌细胞; 生物物理学特性; 细胞骨架
中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0010-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.003

黄曲霉毒素 (aflatoxin, AFT) 是由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*A. parasiticus*) 等真菌产生的次生代谢产物, 在湿热地区易污染花生、玉米等粮食和饲料作物^[1-2]。以 B 族的黄曲霉毒素 B1 (aflatoxin B1, AFB1) 最为常见, 且毒性和致癌性也最强^[3-4]。研究^[2-3,5]显示, AFB1 不仅对肝脏细胞、巨

噬细胞和单个核细胞等有毒性作用, 而且能够促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[6]。鉴于肝癌细胞的增殖和凋亡受众多因素影响且机制复杂, 而细胞的生物物理学特性及细胞骨架结构与细胞形态和功能密切相关^[7-10], 该实验选择肝癌细胞系 HepG2 为研究对象, 利用不同浓度 AFB1 处理后检测 HepG2 细胞的增殖活性, 并在此基础上分析 AFB1 对其生物物理学特性、细胞骨架结构及其结合蛋白的影响, 为从交叉学科的角度探究 AFB1 的毒性及致癌作用机制提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株与毒素 人肝癌细胞株 HepG2 由北京大学医学部生物物理学实验室馈赠。AFB1 购自青岛普瑞邦生物工程有限公司。

1.2 主要试剂 胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司; DMEM 细胞培养基、0.25% 胰蛋白酶、100 mg/L 链霉素、100 U/ml 青霉素购自美国 Hyclone 公司; CCK-8 试剂盒、罗丹明标记的鬼笔环肽、DAPI 购自北京索莱宝科技有限公司; TMA-DPH 购自上海贝博生物科技股份有限公司; RT-PCR 试剂盒购自美国 Thermo-Fisher Scientific 公司; RT-qPCR 试剂盒购自日本 Takara 公司; 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 主要实验仪器 酶标仪 (美国 BioTek 公司)、激光共聚焦显微镜 (日本 Olympus 公司)、F-4600 荧光分光光度计 (日本日立公司)、细胞电泳仪 (北京六一生物科技股份有限公司)、荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)。

1.4 细胞活力检测 复苏、培养 HepG2 细胞, 细胞悬液 ($1 \times 10^5/\text{ml}$) 按 100 μl /孔接种于 96 孔板, 将培养板置于培养箱中过夜培养 12 h, 分别向培养板中加入 10 μl 终浓度为 0、0.01、0.1、1、5 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 AFB1, 每组 3 个重复, 孵育 24 h 或 48 h。每孔加入 10 μl CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h, 酶标仪读取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 值, 按照公式 (处理组 - 空白组) / (对照组 - 空白组) $\times 100\%$ 分析细胞活力。

2022-09-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 21906036); 贵州省自然科学基金资助项目 (编号: 黔科合基础-ZK[2021]重点 029、黔科合平台人才[2021]5637 号、黔科合平台人才[2016]5676)

作者单位: 贵州医科大学¹ 生物与工程学院, 贵州省高等学校免疫细胞与抗体工程研究中心,² 基础医学院, 贵州省感染免疫与抗体工程特色重点实验室/贵州省细胞免疫治疗工程研究中心, 贵阳 550025

作者简介: 于欢, 女, 硕士研究生;

胡祖权, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: huzhuan@gmc.edu.cn;

曾柱, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: zengzhu@gmc.edu.cn

1.5 细胞渗透脆性的检测 配制 295、265、205、85 mOsm/kg 渗透压,分别处理 HepG2 细胞 30 min。每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 培养 2 h,酶标仪测 OD_{450 nm} 值。以 295 mOsm/kg 作为对照,根据处理组/对照组 $\times 100\%$ 统计未破碎细胞百分比。

1.6 细胞膜流动性检测 收集细胞,PBS 洗涤两次,将细胞悬液(1×10^5 /ml)与 TMA-DPH 等体积混合,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。PBS 洗涤两次,将细胞重悬于 1 ml PBS 中。荧光光谱法分析细胞在偏振片于不同角度时的荧光强度 I,激发和发射波长分别为 360 nm 和 430 nm,夹缝宽度为 5 nm,激发电压为 400 V,扫描时间为 10 s;根据 $(I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH})$ 计算荧光偏振度(P)值,其中校正因子 $G = I_{HV} / I_{HH}$; I_{VV} 为起偏器和检偏器光轴同为垂直方向时测得的荧光强度; I_{VH} 为起偏器和检偏器光轴分别为垂直和水平方向时测得的荧光强度; I_{HV} 起偏器和检偏器光轴分别为水平和垂直方向时测得的荧光强度; I_{HH} 起偏器和检偏器光轴同为水平方向测得的荧光强度。

1.7 细胞电泳率检测 细胞用 10% 蔗糖溶液重悬,通过细胞电泳仪,检测电泳迁移率。记录泳动距离(S)、时间(T)及电压(U),通过 $(S/T) / (U/L)$ 计算细胞电泳迁移率(electrophoresis mobility, EPM),其中 L 为电泳槽两极间的距离(4.2 cm)。

1.8 细胞骨架 F-actin 结构分析 细胞经 4% 多聚甲醛固定 1 h,PBS 洗涤后用 0.1% Triton X-100 处理 5 min;PBS 洗涤后加入 1% BSA 封闭 30 min;PBS 洗涤后加入罗丹明标记的鬼笔环肽,避光孵育 30 min;PBS 洗涤后加入 DAPI 溶液避光孵育 5 min,封片并用激光共聚焦显微镜观察 F-actin 结构。

1.9 RT-qPCR 检测基因相对表达量 TRIzol 法提取 mRNA,用逆转录试剂盒合成 cDNA,定量后作为模板进行实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 反应,GAPDH 和一些主要细胞骨架结合蛋白特异性引物见表 1。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,40 个扩增循环(95 $^{\circ}$ C、5 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、30 s)。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式分析实验组靶基因的转录水平变化。

1.10 统计学处理 计算 3 次重复实验的平均值和标准差。使用 Microsoft Excel 分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间比较运用独立样本 t 检验,多组间比较采用方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力分析 采用 CCK-8 试剂盒检测 AFB1 对 HepG2 细胞活力的影响,结果如表 2 所示。不同浓度 AFB1 处理 24 h 后,细胞活力的变化不明显。当处理 48 h 时,AFB1 能够不同程度增强细胞的活力,在 AFB1 浓度为 5 μ mol/L 和 10 μ mol/L 时差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
GAPDH	上游:GACCTGACCTGCCGTCTA 下游:AGGAGTGGGTGTCGCTGT
Thymosin β 4	上游:CCGCTCTTTTGTTCCTGCT 下游:CTGCGTCTCCGTTTCTTCA
Profilin	上游:CTGAGGTGGGTGTCCTGGTT 下游:GCCTCTTGTCAGCTTGGTG
VASP	上游:AGGTAAGGAAACCAATGAGG 下游:CAGAGTGGCAGGCAGAGTGT
WASP	上游:AAGGGCAGAAAGCACCAT 下游:TTCGTCCAAGCATCTCAAAG
α -actinin	上游:CTAACTCAGAAGCGAAGGGAA 下游:ATCCAGTTGTTGAAGGGTGC
Arp2/3 complex	上游:GTTGCCTTCATCCTAACTGCT 下游:CCTATGGGAACCTCGTATTGGT
Capping protein	上游:TAAAGAAGGCTGGAGATGGAT 下游:CGTGGAGGTCAACTGTAAATG
Cofilin	上游:CTGCCTGAGTGAGGACAAGA 下游:TCTTGACAAAAGGTGGCGTAG
Filamin A	上游:CTTTCTCAGTGGCAGTATCTCC 下游:CAGCACCTTTGATTTGACT
ABP	上游:AATGCCCTTTGACCCTCTA 下游:GAATACTGACTTCGGCTTTTGT
Fascin1	上游:CAGGTATGGACCTGTCTGC 下游:CGCCACTCGATGTCAAAGTA
Caldesmon	上游:AGGAGACGTATCCAGCAAGC 下游:CGAATTAGCCCTCTACAACCTGA

表 2 AFB1 对人肝癌细胞 HepG2 细胞活力的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

AFB1 浓度 (μ mol/L)	时间点 (h)	OD 值	细胞活力	F 值
0	24	2.571 \pm 0.088	-	
	48	3.489 \pm 0.098	-	
0.01	24	2.553 \pm 0.063	99.2	0.173
	48	3.578 \pm 0.064	102.7	3.467
0.1	24	2.581 \pm 0.176	100.4	0.013
	48	3.553 \pm 0.082	101.9	1.482
1	24	2.519 \pm 0.124	97.7	0.716
	48	3.604 \pm 0.131	103.5	2.955
5	24	2.540 \pm 0.140	98.7	0.214
	48	3.686 \pm 0.075 *	106.0	15.189
10	24	2.549 \pm 0.089	99.0	0.197
	48	3.784 \pm 0.020 **	109.0	51.581

与 0 μ mol/L 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 细胞渗透脆性变化 不同渗透压处理 30 min 后, HepG2 细胞的渗透脆性随渗透压的增加逐渐减弱(图 1)。在渗透压力为 85 mOsm/kg 时, 10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1 处理组的细胞未破碎率增多, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 表明 AFB1 使 HepG2 细胞的抗张力能力增强。

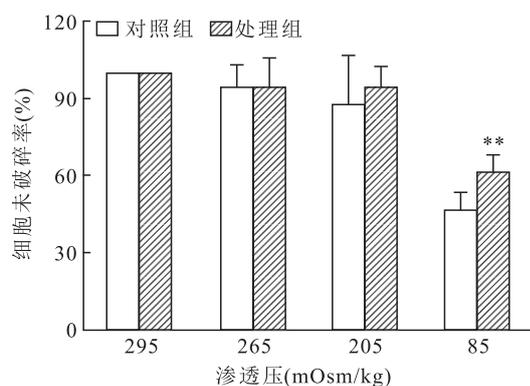


图 1 AFB1 对 HepG2 渗透脆性的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 细胞膜流动性的变化 采用疏水膜荧光探针 TMA-DPH 研究细胞膜的流动性, 荧光偏振度 P 值越小, 表明细胞膜流动性越大。与对照组相比, 经 10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1 处理后 P 值减小, 但差异无统计学意义(图 2)。

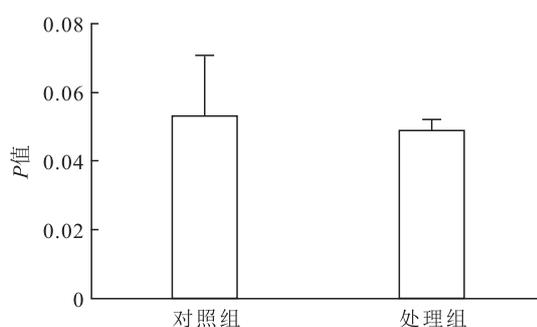


图 2 AFB1 对 HepG2 细胞膜流动性的影响

2.4 细胞电泳率的变化 EPM 能够反映细胞膜表面糖蛋白唾液酸水解使细胞所带负电荷的情况, 结果显示 AFB1 使 HepG2 细胞的 EPM 增加(对照组 vs 处理组), 差异有统计学意义($P < 0.01$) (图 3)。因此, AFB1 使 HepG2 细胞膜表面的电荷量增加。

2.5 细胞骨架 F-actin 结构的变化 激光共聚焦显微镜观察和分析结果如图 4 所示, 正常 HepG2 细胞呈圆球形, 细胞骨架 F-actin 分布较为密集且规律。经 AFB1 处理后细胞胞体变大, 且 F-actin 含量增加

(对照组 vs 处理组), 细胞表面更为粗糙, 出现更多的突起, 表明细胞骨架结构发生重塑。

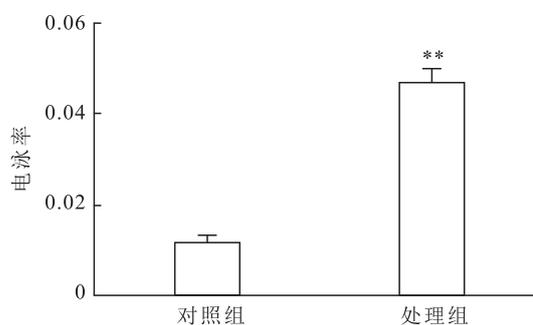


图 3 AFB1 对 HepG2 细胞电泳率的影响
与对照组比较: ** $P < 0.01$

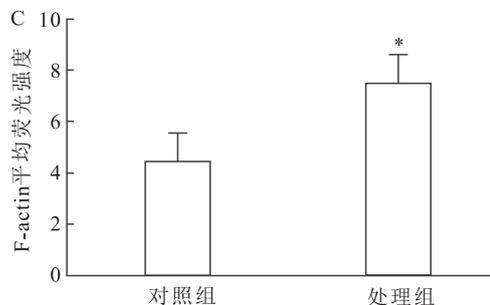
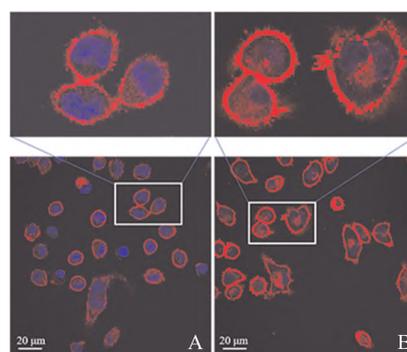


图 4 AFB1 对 HepG2 细胞 F-actin 的影响
A: 对照组; B: AFB1 处理组; C: F-actin 含量统计; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.6 微丝结合蛋白的转录变化情况 细胞骨架 F-actin 重塑是在多种细胞骨架结合蛋白的持续参与下通过不断地解聚和聚合来完成。本实验利用 RT-qPCR 检测 12 种主要细胞骨架结合蛋白在 mRNA 水平的表达情况(图 5)。AFB1 处理后, 细胞骨架结合蛋白的表达发生了改变。促聚蛋白和细丝蛋白 A 的转录下调, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 钙调素结合蛋白、血管扩张刺激磷酸蛋白 (vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)、威奥综合征蛋白 (wiscott-Aldrich syndrome protein, WASP)、加帽蛋白、丝切蛋白、肌球蛋白相关蛋白 2/3 复合体 (actin-related

protein 2/3 complex, Arp2/3 complex)、胸腺素 $\beta 4$ 、 α -辅肌动蛋白、肌动蛋白结合蛋白 (actin-binding protein, ABP) 和成束蛋白 1 等 10 个细胞骨架结合蛋白的基因转录水平发生上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

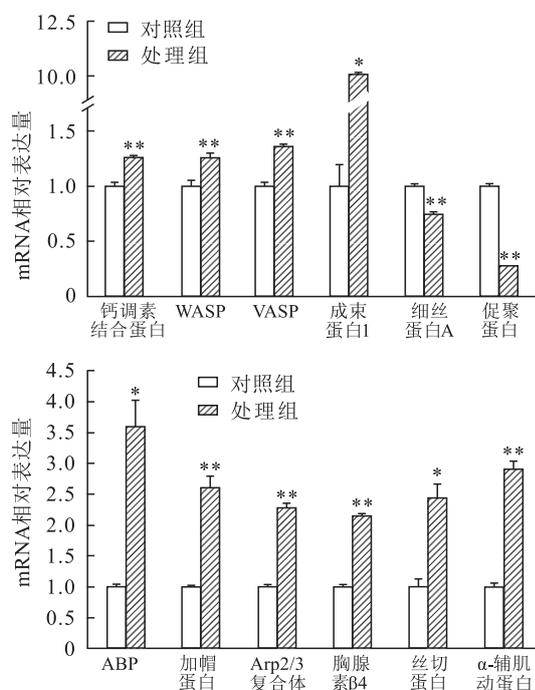


图5 AFB1对HepG2细胞骨架结合蛋白的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

黄曲霉毒素具有很强的细胞毒性、免疫毒性、致癌性、致畸性和致突变性, 对人和动物的正常肝脏组织有破坏作用, 是导致肝癌发病的主要病因之一, 但现有研究显示其对肿瘤细胞的作用与正常细胞存在很大的差异。本实验中, 随着 AFB1 处理浓度的增高和作用时间的延长, HepG2 细胞活力显著增强, 与许菊萍^[6]发现低浓度 AFB1 能够促进肝癌细胞增殖的结果相一致。

细胞的生物物理学特性可以反映其结构和功能的关系, 主要包括渗透脆性、膜流动性和细胞电泳率等。在肿瘤微环境中, 肿瘤细胞通过改变生物物理学特性对基质硬度等力学刺激作出响应, 从而促进肿瘤细胞生长, 因此, 肿瘤细胞的生物物理学参数的改变与癌症的进程具有相关性^[8-9]。渗透脆性指细胞抗低渗溶液的能力, 是反映细胞膜支撑结构的一个重要指标^[7]。AFB1 处理 HepG2 后, 细胞的渗透脆性明显减小 (图 1), 在渗透压为 85 mOsm/kg 时,

差异有统计学意义, 表明细胞抗张力能力显著增强, 细胞不容易溶解, 反而更能够适应不同的微环境。质膜的流动性在细胞生长和分化等过程中发挥重要作用^[11]。本实验中, 10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1 处理后荧光偏振度 P 值略微降低 (图 2), 暗示 AFB1 可能使 HepG2 细胞的膜脂成分或结构发生改变, 也可能与细胞形态变化和细胞骨架重塑有关。EPM 是反映细胞表面电荷密度的重要生物物理参数^[7,10], 还与细胞周期相关, 处于有丝分裂期细胞的电泳率更高^[12]。AFB1 处理 HepG2 细胞后, EPM 显著上升 (图 3), 这可能是 AFB1 使细胞活力增加的缘故。因此, AFB1 能够通过影响 HepG2 细胞的生物物理学特性来影响其细胞结构和功能。

细胞骨架系统的动态重塑对于维持细胞结构和发挥功能至关重要^[13]。在本实验中, AFB1 使 HepG2 的 F-actin 表达显著增加 (图 4), 表明 HepG2 暴露于 AFB1 后其细胞骨架 F-actin 发生重塑; 而且细胞表面更为粗糙, 出现更多突起, 可能增加了细胞的侵略性^[9]。F-actin 重塑离不开细胞骨架结合蛋白的调控^[7], 本实验结果也显示 12 种主要细胞骨架结合蛋白的基因转录发生了明显变化 (图 5), 表明这些蛋白参与了细胞骨架的重塑过程。这些细胞骨架结合蛋白在肿瘤的发生发展中同样起着重要作用, Shi et al^[14] 研究显示 Hippo-Yap 通过活化 cofilin/F-actin/lamellipodium 信号轴来影响细胞骨架结构重塑和伪足形成, 进而促进肝细胞癌的发生发展; Huang et al^[15] 分析显示 Arp2/3 复合体的高表达与肝癌患者较差的预后相关, 其亚基 ACTR3、ARPC2 和 ARPC5 可作为肝癌进展的独立预后因子。这些结果表明 AFB1 对细胞骨架结合蛋白表达的影响可能与其促进肝细胞癌的发生发展有密切联系。

本研究从交叉学科的角度研究了 AFB1 对 HepG2 的细胞活力、渗透脆性、膜流动性、电泳率、细胞骨架结构及其结合蛋白表达的影响, 结果显示 AFB1 能影响 HepG2 的生物物理学特性并重塑细胞骨架结构, 这为进一步解析 AFB1 的毒性机制提供了新的方向。

参考文献

- [1] Nugraha A, Khotimah K, Rietjens I M C M. Risk assessment of aflatoxin B1 exposure from maize and peanut consumption in Indonesia using the margin of exposure and liver cancer risk estimation approaches[J]. Food Chem Toxicol, 2018, 113:134-44.
- [2] Bianco G, Russo R, Marzocco S, et al. Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1

- and M2[J]. *Toxicon*, 2012, 59(6): 644–50.
- [3] Malvandi A M, Mehrzad J, Saleh-moghaddam M. Biologically relevant doses of mixed aflatoxins B and G up-regulate MyD88, TLR2, TLR4 and CD14 transcripts in human PBMCs[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(4): 528–32.
- [4] Rushing B R, Selim M I. Aflatoxin B1: a review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods[J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 124: 81–100.
- [5] 庞惠萍, 丁泽, 苏娜, 等. 黄曲霉毒素 B1 致肝脏损伤的机制[J]. *动物医学进展*, 2019, 40(12): 110–3.
- [6] 许菊萍. 黄曲霉毒素 B1 对肝癌细胞株 SMMC-7721 的影响[D]. 郑州: 郑州大学, 2009.
- [7] Hu Z Q, Xue H, Long J H, et al. Biophysical properties and motility of human mature dendritic cells deteriorated by vascular endothelial growth factor through cytoskeleton remodeling [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): 1756.
- [8] Mierke C T. The matrix environmental and cell mechanical properties regulate cell migration and contribute to the invasive phenotype of cancer cells[J]. *Rep Prog Phys*, 2019, 82(6):064602.
- [9] 王瑜华, 蒋宁城, 徐朝贤, 等. 基于原子力显微术的肿瘤细胞生物物理特性研究[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 32(1): 120–4.
- [10] Zhao X, Wang Y, Liu J L, et al. Fumonisin B1 affects the biophysical properties, migration and cytoskeletal structure of human umbilical vein endothelial cells[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2020, 78(3): 375–82.
- [11] Le G J, Morjani H, Fardel O, et al. Conformational changes in membrane proteins of multidrug-resistant K562 and primary rat hepatocyte cultures as studied by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Anticancer Res*, 1994, 14(4A):1541–8.
- [12] Mayhew E. Cellular electrophoretic mobility and the mitotic cycle [J]. *J Gen Physiol*, 1966, 49(4):717–25.
- [13] Tang D D, Gerlach B D. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration[J]. *Respir Res*, 2017, 18(1):54.
- [14] Shi C, Cai Y, Li Y, et al. Yap promotes hepatocellular carcinoma metastasis and mobilization *via* governing cofilin/F-actin/lamellipodium axis by regulation of JNK/Bnip3/SERCA/CaMKII pathways [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 59–71.
- [15] Huang S, Li D, Zhuang L, et al. Identification of arp2/3 complex subunits as prognostic biomarkers for hepatocellular carcinoma [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 690151.

Effects of aflatoxin B1 on the biophysical properties and cytoskeleton structure of hepatocellular carcinoma cell line HepG2

Yu Huan¹, Yu Yanqin^{1,2}, Qian Tianbao¹, Liu Qingyu¹, Wang Yun², Zeng Zhu², Hu Zuquan^{1,2}

(¹*Immune Cells and Antibody Engineering Research Center in University of Guizhou Province, School of Biology and Engineering*, ²*Key Laboratory of Infectious Immune and Antibody Engineering of Guizhou Province, Engineering Research Center for Cellular Immunotherapy of Guizhou Province, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550025*)

Abstract Objective To investigate the effects of aflatoxin B1 (AFB1) on the biophysical properties and cytoskeleton structure of human hepatocellular carcinoma cells (HCCs). **Methods** HepG2 cells were respectively treated with 0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1 for 24 h and 48 h, and the cell viability was measured by CCK-8 kit. Based on this result, the influences of 10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1 on the osmotic fragility, membrane fluidity, electrophoretic mobility (EPM) and F-actin structure of cells were analyzed. Subsequently, total RNAs were extracted and the transcription-level changes of twelve main cytoskeleton binding proteins were detected by real-time quantitative PCR. **Results** The increased viability of HepG2 cells was induced by AFB1 in a dose-dependent manner after 48 h treatment. After treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ AFB1, the anti-hypotonic ability and EPM of HepG2 cells were enhanced. The content of F-actin in HepG2 cells increased obviously, while the mRNA expression levels of the main cytoskeleton binding proteins were altered. **Conclusion** AFB1 can affect the biophysical properties, cytoskeleton structure and its binding proteins of HepG2 cells, which may be directly related to its toxic action.

Key words aflatoxin; hepatocellular carcinoma cells; biophysical properties; cytoskeleton